用微卫星引物 PCR 分析棉蚜不同蚜型的 DNA 多态性

龚 鹏[1]，张孝羲[1]，杨效文[2]，陈晓峰[2]
（1. 南京农业大学植物保护系，南京 210095；2. 中国科学院动物研究所，北京 100080）

摘要：用微卫星引物 PCR 方法，对棉蚜 *Aphis gossypii* 干母、干雌、孤雌蚜（有翅迁飞孤雌蚜和无翅孤雌蚜）、性母、性雌蚜和雄蚜的 DNA 多态性进行分析。结果表明：① 棉蚜的有性蚜型和无性蚜型之间在遗传上有较大的差异；② 性母与性雌蚜和雄蚜的遗传关系都十分接近，说明同一性母既产性雌蚜，也产雄蚜；③ 干母和干雌的遗传关系很近，但孤雌蚜已与二者有分化。

关键词：棉蚜；蚜型；微卫星引物；PCR；DNA 多态性

中图分类号：Q963 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2001）04-0416-06

棉蚜 *Aphis gossypii* 属同翅目（Homoptera）蚜科（Aphididae）蚜属（*Aphis*），是一种世界性害虫，在北纬 60°至南纬 40°均有分布。由于适应分布区域生态条件的差异，其适应性有很大的分化，形成了不同的生活史类型。常见的生活史类型有完全周期生活史、不完全周期生活史和兼性周期生活史。一般全周期蚜虫有 5～6 个蚜型：干母、干雌、孤雌蚜（有翅孤雌蚜和无翅孤雌蚜）、性母、性雌蚜和雄蚜。棉蚜不同蚜型在形态上有显著的差异[1～3]，而且，孤雌胎生雌蚜和有性雌蚜在胚胎发育上可能具有不同的生理和遗传机制。

蚜虫在植物生长季节大都行孤雌生殖，一般仅在秋末冬初行两周左右的有性生殖[4]。由于生长季节孤雌胎生蚜造成的危害大，因而有关此类蚜型的研究报道较多，而且在分类上大多以孤雌胎生蚜形态指标为分类依据，对于性蚜则很少有人研究。但这短暂的有性阶段中却发生着连续孤雌生殖阶段不能实现的基因重组，是棉蚜种群基因交流的关键环节。研究棉蚜的有性阶段对了解棉蚜种群遗传结构的组成和动态变化，进而制定科学有效的防治策略有重要意义。

有学者对棉蚜的几种蚜型进行了形态学的解剖、描述[5]和发生规律的观察[6]。本研究中我们用微卫星引物 PCR 扩增方法，对棉蚜干母、干雌、孤雌蚜（有翅迁飞孤雌蚜和无翅孤雌蚜）、性母、性雌蚜和雄蚜进行遗传分析，试图更深入了解它们之间的遗传差异和相互关系。

1 材料与方法

1.1 棉蚜样品采集与保存

本实验所用棉蚜（表 1）均采自室外的木槿（冬寄主）和棉花（夏寄主）上，在间距 1 m

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39630210）
收稿日期：1999-09-27；接受日期：2000-05-25

以上的植株上分散采集，以保证每头棉蚜来自不同的克隆。样品采集于盛有无水乙醇的 1.5 mL 离心管，－20℃保存。

表 1　本研究所用棉蚜样品

Table 1　Samples of cotton aphid in this study

样品 Sample	蚜型 Form	寄主植物 Host plant	采集时间 Collection date	采集地点 Collection location
A	性母（有翅）	木槿	1998.10	南京农业大学
	mother of mating forms（alate）	hibiscus	Oct. 1998	Nanjing
B	性雌蚜（无翅）	木槿	1998.11	南京农业大学
	mating female（apterous）	hibiscus	Nov. 1998	Nanjing
C	雄蚜（有翅）	木槿	1998.11	南京农业大学
	male（alate）	hibiscus	Nov. 1998	Nanjing
D	干母（无翅）	木槿	1999. 3	南京农业大学
	fundatrix（apterous）	hibiscus	Mar. 1999	Nanjing
E	干雌（无翅）	木槿	1999. 3	南京农业大学
	virginoparae（apterous）	hibiscus	Mar. 1999	Nanjing
F	迁移蚜（有翅）	棉花	1999. 5	江苏农业科学院
	virginoparae（alate）	cotton	May 1999	Nanjing
G	孤雌蚜（无翅）	棉花	1999. 5	江苏农业科学院
	virginoparae（apterous）	cotton	May 1999	Nanjing

注：干雌（样品 E）为干母（样品 D）所产之后代 The sample E is the daughter of fundatrix

1.2　棉蚜基因组 DNA 提取

将 30 头棉蚜装入 1.5 mL 离心管，置液氮中冷冻 10 min，取出捣碎后加入 1×STE 缓冲液 500 μL，10 mg/mL 蛋白酶 15 μL，20% SDS 12.5 μL，混匀后置于 55℃保温 8 h 以上。然后，依次用等体积的 Tris 饱和酚、酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇抽提，加入冰冷的无水乙醇 900 μL 和 3 mol/L 醋酸钠（pH 7.0）50 μL，混匀后置于－20℃ 0.5 h；12 000 r/min 离心，用 70%乙醇洗涤 1 次，37℃干燥后，加入 TE（pH 8.0）100 μL 室温下溶解 DNA。待 DNA 溶解后，加入 1 mg/mL 的 RNA 酶 20 μL 置于 37℃ 1 h。DNA 于－20℃保存待用。

1.3　微卫星引物 PCR 扩增

扩增反应液含模板 DNA（棉蚜基因组 DNA）3 μL，微卫星引物 15 ng，dNTP 5 mmol/L，Taq 酶 1.5 单位，10×buffer（含 Mg^{2+}），用双蒸水将反应总体积加至 25 μL，再加石蜡油 25 μL。

PCR 扩增在 PE480 DNA 扩增仪上进行，条件为 94℃ 5 min，然后进行 45 个循环，即 94℃ 1 min、退火 1 min、72℃ 2 min，最后在 72℃延伸 10 min，扩增产物保存于 4℃。本研究选用的 3 种微卫星引物（北京赛百盛生物工程公司合成）及其 PCR 扩增反应的最适退火温度见表 2。

1.4　扩增产物的检测和记录

将扩增后的 DNA 在含有 0.5 μg/mL EB（ethidium bromide）的 1.2%的琼脂糖胶上电泳，上样量为 15 μL，电压 70 V，电泳缓冲液为 1×TAE。电泳结束后，一方面在蛋白-核酸自动成像

仪（Stratagene Eagle Eye-Ⅱ）中根据标准分子量 Marker（本研究中为 λDNA /*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ Marker）标识每条扩增带的分子量大小，记录绘制扩增谱带型，同时扩增谱带可在热敏纸上自动成像。另一方面，用照相机在紫外透射分析仪上对琼脂糖胶上的扩增条带进行拍照，以照片形式对扩增结果进行记录。

表2 本研究所用的微卫星引物

Table 2 The microsatellite primers used in this study

微卫星引物 Microsatellite primers	碱基序列 Sequence（5′-3′）	退火温度（℃） Annealing temperature
33.15 core sequence	5′-AGAGGTGGGCAGGTG-3′	54
$(GATA)_4$	5′-GATAGATAGATAGATA-3′	36
$(CAC)_5$	5′-CACCACCACCACCAC-3′	57

1.5 数据统计分析

根据分子量大小对扩增结果读带，然后将扩增条带的有无转变为可供计算机处理的 1-0 数据。根据微卫星引物扩增结果统计各类群的扩增条带数和两两类群间的共有带数，然后计算类群间的相似性指数（*SI*）：$SI = 2N_{AB}/(N_A + N_B)$。N_A：类群 A 的带数；N_B：类群 B 的带数；N_{AB}：A 和 B 两个类群的共有带数。将 3 个微卫星引物 PCR 扩增结果的相似性指数进行平均，然后将平均相似性指数的矩阵用 $1 - SI$ 换算成距离矩阵，再用 SAS（6.04）平均聚类法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 微卫星引物对棉蚜不同蚜型的基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

不同微卫星引物对棉蚜不同蚜型基因组 DNA 进行 PCR 扩增，得到的扩增片段的大小有所不同。33.15 核心序列的扩增片段在 706～3 530 bp，$(GATA)_4$ 的扩增片段在 920～2 147 bp，$(CAC)_5$ 的扩增片段在 705～2 438 bp。

33.15 核心序列的扩增片段中，有一条大小为 706 bp 的主带，明亮宽阔，也是这几种蚜型的共有带，蚜型间的差异表现在（1）其它扩增条带的有无：如无性蚜型（D、E、F、G）在 3 530 bp、1 921 bp 和 1 613 bp 位置上均有扩增条带，而有性蚜型（A、B、C）在这些位置均无条带出现，尤其 1 921 bp 和 1 613 bp 位置上的扩增条带较明显，雄蚜（C）在 1 358 bp 位置上有一条较明亮且其它蚜型均无的扩增带，雌性蚜（B）在 1 854 bp 位置上有一条较弱但其它蚜型均无的扩增带；（2）其它扩增条带的明暗宽窄：有性蚜型（A、B、C）在 1 158 bp 位置上的扩增条带亮且宽，而无性蚜型中的干母（D）和干雌（E）在此位置无条带出现，无性蚜型中的迁移蚜（F）和无翅孤雌蚜（G）在此位置为弱带（图 1：a）。

$(GATA)_4$ 的扩增片段中有两条共有带，大小分别是 1 725 bp 和 2 147 bp。蚜型间的差异同样表现在其它非主带的有无和明暗宽窄上。有性蚜型（A、B、C）在 1 348 bp 和 1 114 bp 位置上均有扩增条带，而无性蚜型（D、E、F、G）在这两个位置上无条带出现。迁移蚜（F）和无翅孤雌蚜（G）在 1 425 bp 位置上有条较明亮且其它蚜型均无的扩增带（图 1：b）。

$(CAC)_5$ 的扩增片段中也有两条共有带，片段大小分别是 871 bp 和 1 094 bp，蚜型间的差异表现在扩增条带的有无和明暗宽窄上。如 871 bp 和 1 094 bp 位置的条带在这 7 种蚜型中都出现，但迁移蚜（F）和无翅孤雌蚜（G）在这两个位置上的条带亮度和宽度不及其它 5 种蚜型。同时迁移蚜（F）和无翅孤雌蚜（G）在 1 290 bp 和 1 564 bp 位置有扩增条带而其它 5 种蚜型在这两个位置没有条带。干母（D）和干雌（E）在 705 bp 位置无条带出现而其它 5 种蚜型在此位置有扩增条带（图 1：c）。

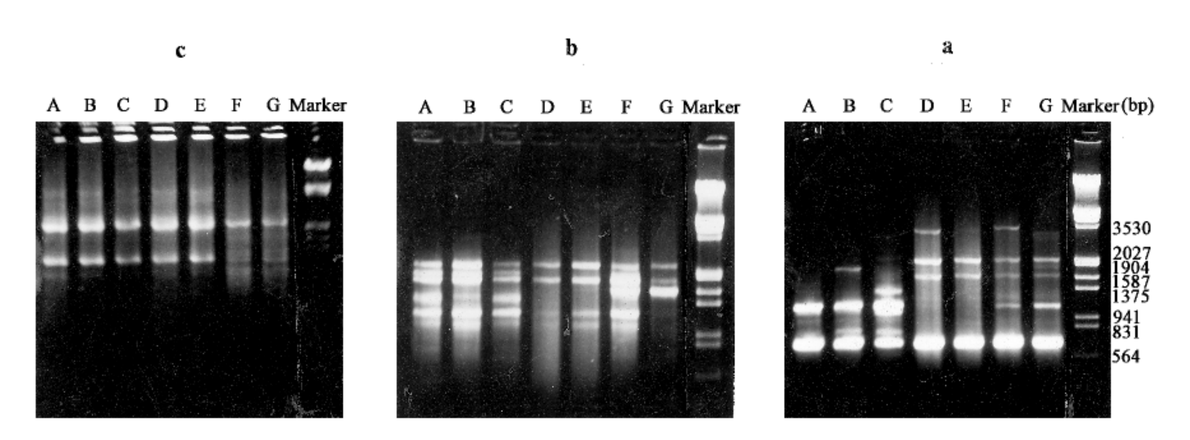


图 1　微卫星引物对棉蚜不同蚜型的 PCR 扩增结果

Fig. 1　PCR results of microsatellite primer to different forms of cotton aphid

a. 33.15 核心序列 33.15 core sequence；b. $(GATA)_4$；c. $(CAC)_5$；

A. 性母 mother of mating forms；B. 雌性蚜 mating female；C. 雄蚜 male；D. 干母 fundatrix；

E. 干雌 daughter of fundatrix；F. 有翅迁移蚜 virginoparae (alate)；G. 孤雌蚜 virginoparae (apterous)；

Marker. 标准分子量 *Eco*RⅠ-*Hin*dⅢ digest Lambda DNA

2.2　棉蚜不同蚜型间的相似性指数及聚类分析

根据 3 种微卫星引物对棉蚜 7 种蚜型的 PCR 扩增结果（图 1）可以统计得到 7 种蚜型各自的扩增条带数和两两蚜型间的共享条带数，计算出 7 种蚜型间的相似性指数，并将三种微卫星引物扩增得到的相似性指数进行平均，得到棉蚜 7 种蚜型间平均相似性指数（表 3）。相似性指数的大小可比较不同类群间遗传关系的亲疏。

表 3　棉蚜不同蚜型间的平均相似性指数

Table 3　Average similarity index among different forms of cotton aphid

	A	B	C	D	E	F	G
A	1						
B	0.820	1					
C	0.857	0.880	1				
D	0.550	0.574	0.528	1			
E	0.650	0.674	0.628	0.889	1		
F	0.742	0.746	0.710	0.676	0.776	1	
G	0.570	0.581	0.583	0.733	0.657	0.863	1

样品 A～G 同表 1 Samples A～G refer to Table 1

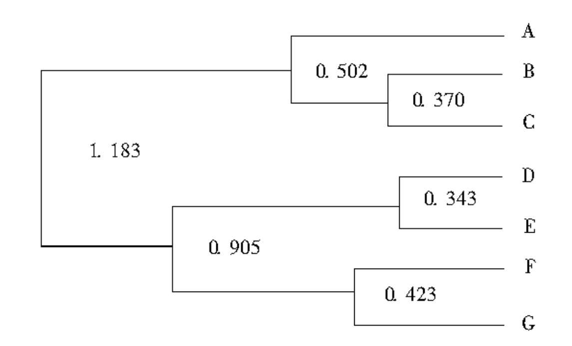


图2 棉蚜蚜型间的平均相似性指数的聚类分析
Fig. 2 Dendrogram generated by cluster analysis of similarity index among different forms of the cotton aphid
样品 A~G 同表1 Samples A~G refer to Table 1

棉蚜7种蚜型间平均相似性指数范围为：0.528~0.889。其中干母（D）与干雌（E）的相似性指数最大，为0.889。性母（A）、性雌蚜（B）和雄蚜（C）三者间的相似性指数较大，分别为0.820、0.857和0.880；迁移蚜（F）和孤雌蚜（G）的相似性指数也较大，为0.863。这三类蚜型，每一类内的样本之间的相似性指数均大于0.8。

按7种蚜型间的平均相似性指数（*SI*）以1－*SI*换算为距离矩阵，然后用SAS（6.04）软件进行聚类分析，结果见图2。可以看出，棉蚜的7种蚜型可分为两大类，即有性蚜型（性母蚜、雄蚜和性雌）为一类，无性蚜型（迁移蚜、孤雌蚜、干母和干雌）为一类。

聚类图表明：当 $\lambda=0.343$ 时，干母和干雌首先聚在一起；当 $\lambda=0.370$ 时，雄蚜和性雌聚在一起；当 $\lambda=0.423$ 时，迁移蚜和孤雌蚜聚在一起；当 $\lambda=0.502$ 时，3种有性蚜型（性母蚜、雄蚜和性雌）聚在一起；当 $\lambda=0.905$ 时，4种无性蚜型（迁移蚜、孤雌蚜、干母和干雌）聚在一起；最后，当 $\lambda=1.183$ 时，这7种蚜型聚在一起。

上述结果表明：1）棉蚜的有性蚜型与无性蚜型之间在遗传上有较大的差异；2）性母与性雌蚜和雄蚜的遗传关系都十分接近；3）干母和干雌的遗传关系很近，但孤雌蚜已与二者有分化。

3 讨论

3.1 无性蚜型和有性蚜型在DNA水平有明显差异

棉蚜不同蚜型，尤其是孤雌胎生蚜与性蚜在形态上有显著的差异[1~3]。丁锦华等[7]根据对棉蚜交配产卵的观察推测：孤雌胎生雌蚜和有性雌蚜在胚胎发育上可能具有不同的生理和遗传机制。本研究直接证实棉蚜的无性蚜型和有性蚜型在DNA水平有明显差异。由此可见，棉蚜复杂的世代交替生活史类型中有性世代与无性世代在DNA多态性上有明显的分化。

3.2 孤雌蚜与干母和干雌有明显分化

本研究结果表明，棉蚜从有性繁殖卵中孵化的干母和干雌的遗传关系很近，而以后的孤雌蚜与其有明显分化。事实上，棉蚜的干母和干雌的食性很窄，一般仅能在越冬寄主上存活，而孤雌蚜的食性则较宽。干雌所生的孤雌蚜在食性上的拓宽与棉蚜的寄主选择及寄主转移通道密切相关，其食性分化的机理值得进一步探讨。

3.3 棉蚜有性蚜的发生

早期文献中关于棉蚜有性蚜的发生大致有两种记载：一是由棉田产生有翅性母蚜飞回冬季主，产生雌、雄性蚜，交配后产卵越冬；二是从棉田产生的雌性母飞回越冬寄主，产生性

雌蚜，再与从棉田飞来的雄性蚜交配，并产卵越冬。赵惠燕等[5]证实有翅雄蚜来自第二寄主，有翅性母蚜迁飞至第一寄主上才产生无翅雌性蚜。丁锦华等[6]的观察结果表明：木槿上的雌性母主要是从棉田迁入，然后繁殖性雌蚜，再与棉田迁来的雄性蚜交配产卵。

我们在秋末冬初的木槿上观察到性母产性雌蚜的情形，但未见到木槿上性母产雄蚜，木槿上的雄蚜可能是在棉花等第二寄主上产生后飞至第一寄主（木槿）与性雌蚜交配，产卵越冬。并且观察到，有的年份在第二寄主棉花上可同时产生性雌蚜和雄蚜，并交配产卵。从本研究的结果看，性母与性雌蚜、性母与雄蚜的遗传关系十分接近，据此可认为，性母不仅是雌性母，亦可能同时也是雄性母（同桃蚜的情形），但这需进一步的观察以证实。

从理论上讲，棉蚜的性母蚜可分别在第一寄主和第二寄主产生性雌蚜和雄蚜，雄蚜经过迁飞与性雌蚜交配，这样大大增加了基因交流的机会，在进化上十分有利。

参　考　文　献（References）

[1] Inaizumi M. On the setae of the 8th abdominal tergite in *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). Kontyu, 1983, 51 (1): 9～16

[2] Roy D K, Behura B K. Seasonal variation in the morphology of *Aphis gossypii* Glover. Pranikee, 1983, 4: 52～59

[3] Inaizumi M. Morphologies and determination of larval instars of winged morphs in *Aphis gossypii* Glover (Homoptera, Aphididae). Japanese Journal of Entomology, 1990, 58 (4): 887～893

[4] 朱弘复. 蚜虫概论. 北京：科学出版社，1967. 42～43

[5] 赵惠燕，汪世泽，张改生等. 棉蚜性蚜的研究. 昆虫知识，1994，31 (3)：145～148

[6] 丁锦华. 棉蚜有性世代的观察. 昆虫知识，1995，32 (3)：141～143

[7] 丁锦华，傅 强. 有性棉蚜交配和产卵习性的观察. 昆虫知识，1994，31 (4)：217～219

Microsatellite DNA polymorphism in different forms of the cotton aphid

GONG Peng[1], ZHANG Xiao-xi[1], YANG Xiao-wen[2], CHEN Xiao-feng[2]

(1. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The PCR technique with microsatellite primers was used to analyze the DNA polymorphism in different forms (mother of mating forms, mating female, male, fundatrix, apterous and alate virginoparae) of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. The results showed that: 1. There existed a obvious genetic differentiation between sexual forms and parthenogenetic forms of the cotton aphid; 2. Mother of mating forms had almost the same genetic relation to the mating female and male, suggesting that the mother of mating female also be the mother of male; 3. Compared with virginoparae, the genetic relationship between fundatrix and the first generation of virginoparae (apterous) produced by fundatrix (apterous) was much close.

Key words: *Aphis gossypii*; forms; microsatellite primers; PCR; DNA polymorphism